

**Utilisation de la somatostatine ou d'un de ses analogues pour préparer un médicament destiné à réguler la réserve folliculaire ovarienne chez la femme non ménopausée**

L'invention concerne l'utilisation de la somatostatine ou d'un de ses analogues agonistes pour préparer un médicament destiné à réguler la réserve folliculaire ovarienne chez la femme non ménopausée, ou celle d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour préparer un médicament destiné à accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents chez la femme non ménopausée. L'invention concerne encore l'utilisation *in vitro* de la somatostatine ou d'un de ses analogues agonistes pour inhiber l'entrée en croissance de follicules quiescents dans un tissu ovarien, ou l'utilisation *in vitro* d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents dans un tissu ovarien.

10 Chez la femme, comme chez tous les mammifères, la fertilité est dépendante de la présence dans les ovaires des gamètes femelles appelés "ovocytes". Dans l'espèce humaine, le capital ovocytaire est constitué une fois pour toutes à la naissance ; le nombre d'ovocytes est alors compris entre 500 000 et 1 million par ovaire. Ces ovocytes sont entourés de quelques cellules de la granulosa ; cet ensemble fonctionnel est appelé follicule ovarien (Gougeon, A., *Endocrine Reviews* (1996), 17, 121-155). A la naissance, mais aussi tout au long de la vie jusqu'à la ménopause, la majorité des follicules ovariens sont à un stade de repos.

15 Dès sa constitution, le capital ovocytaire s'amenuisera progressivement : ainsi, il y aura environ 200 000 follicules par ovaire à la puberté, environ 80 000 à 20 ans, environ 30 000 à 30 ans, environ 10 000 à 40 ans, le capital étant pratiquement épuisé vers l'âge de 50 ans (cf. Gougeon, A. et Lefèvre, B., « Folliculogénèse et maturation ovocytaire » dans *Médecine de la reproduction*, 3<sup>e</sup> édition, Ed. Flammarion, p. 49). L'épuisement du capital ovocytaire correspond cliniquement à la ménopause. Les follicules au repos présents dans l'ovaire à un moment donné constituent la "réserve ovarienne".

20 25 Deux mécanismes sont impliqués dans l'épuisement progressif de la réserve ovarienne. Environ 80% des follicules disparaîtront par entrée en apoptose, tandis que les 20% restants entreront en croissance. Ces derniers entreprendront alors un long processus de développement (environ 6 mois) menant une minorité d'entre eux (environ 400 pendant toute la vie) au stade de follicules préovulatoires contenant un ovocyte mature apte à être fécondé (Gougeon, A., *Endocrine Reviews* (1996), 17, 121-155). La majorité des

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

follicules en croissance disparaissent par apoptose conduisant à leur involution ; l'apoptose les frappe à n'importe quel stade de leur développement.

Le passage du stade follicule quiescent au stade de follicule en croissance est un phénomène continu mais d'intensité variable. En particulier, il s'accélère dans les 10 à 5 15 années précédant la ménopause, dès l'âge d'environ 38 ans.

Les facteurs stimulant les premières étapes de croissance (à partir du grand follicule primaire) sont relativement bien connus. Ils incluent les gonadotrophines (LH et FSH) mais surtout des facteurs de croissance et des stéroïdes tels que les androgènes. Par contre, les mécanismes contrôlant l'initiation de la croissance folliculaire sont mal 10 connus. Il est bien établi que cette étape de la folliculogénèse n'est pas dépendante des gonadotrophines (LH et FSH) (cf. par exemple Bullun, S. et Adashi, E., *Williams Textbook of Endocrinology*, Tenth Edition (2003), 587-664). Une hormone nommée 15 AMH (Anti-Mullerian hormone) pourrait être impliquée dans le maintien en quiescence des follicules tandis qu'un peptide nommé Kit-Ligand (aussi appelé SCF) pourrait être impliqué dans l'activation des follicules au repos vers la croissance. En outre, un facteur de croissance nommé GDF-9 semble important pour soutenir la croissance une fois enclenchée.

La somatostatine (SST) est un peptide cyclique présent sous deux formes dans l'organisme, une forme contenant 14 acides aminés et une forme contenant 28 acides 20 aminés. L'activité biologique de ces deux formes de SST est semblable. La forme SST-14 est la forme prédominante au niveau du système nerveux central. Elle inhibe la sécrétion de l'hormone de croissance par les cellules somatotropes de l'anté-hypophyse. La forme SST-28 est préférentiellement exprimée au niveau de l'estomac et du pancréas. L'activité biologique de la SST est induite par l'intermédiaire d'une série de récepteurs 25 membranaires couplés à une protéine G, dont 5 sous types ont été caractérisés, à savoir les sous-types SSTR1 à SSTR5 (Reubi, J.C., *Cancer Res.*, **47**, 551-558 ; Resine, T., et coll., *Endocr. Review*, **16**, 427 – 442 ; Lamberts, SW. et coll., *Endocr. Review*, **12**, 450-482).

La présence de SST au niveau de l'ovaire a été démontrée chez plusieurs espèces dont le 30 porc (Mori, T. et coll., *Acta Endocrinol. (Copenh.)* (1984), **106**(2), 254-259), le rat (McNeill, D.L. et coll., *Am. J. Anat.* (1987), **179**(3), 269-76) et la femme (Holst et coll., *Hum. Reprod.* (1994), **9**(8), 1448-1451). Les récepteurs à la SST ont été identifiés dans l'ovaire du rat (Lidor, A. et coll., *Gynecol. Endocrinol.* (1998), **12**(2), 97-101) ainsi que dans l'ovaire humain en particulier les sous types 1, 2A et 5 (Strauss et coll., *Hum. Reprod.* (2003), **18**, Suppl. 1, P-495).

La contribution de la SST dans la physiologie ovarienne a été étudiée par plusieurs auteurs. Chez le rat, l'administration *in vivo* de SST semble réduire le nombre de cellules hypophysaires produisant LH et FSH ainsi que le nombre de follicules pré-ovulatoires dans l'ovaire (Nestorovic et coll., *Histochem. J.* (2001), 33(11-12), 695-702). *In vitro*, la SST inhibe l'aromatase et la production de progestérone, stimulées par FSH, dans un modèle de cellules de la granulosa (Andreani, C.L. et coll., *Hum. Reprod.* (1995), 10(8), 1968-1973). Chez le porc, la SST inhibe l'augmentation de l'AMPc induite par LH et la forskoline dans les cellules de la granulosa (Rajkumar, K. et coll., *J. Endocrinol.* (1992), 134(2), 297-306), et semble inhiber la maturation nucléaire de l'ovocyte préovulatoire (Mori, T. et coll., *Acta Endocrinol. (Copenh.)* (1985), 110(3), 408-412). Chez la femme, des études *in vitro* sur des cellules de la granulosa issues de follicules pré-ovulatoires suggèrent un rôle inhibiteur direct de la SST sur la synthèse de l'IGF-BP1 et de la progestérone (Holst, N. et coll., *Fertil. Steril.* (1997), 68(3), 478-482). Chez la femme, *in vivo*, SST est capable de réduire la sécrétion de LH par l'hypophyse, de diminuer la production d'androgènes et les taux sériques de l'IGF-1. Par contre, SST augmente les taux sériques de l'IGF-BP3 (Fulghesu, A.M. et coll., *Fertil. Steril.* (1995), 64(4), 703-708; Piaditis, G.P. et coll., *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* (1996), 45(5), 595-604). La SST a été co-administrée avec de la FSH lors de traitement d'induction de l'ovulation chez des patientes présentant une infertilité résultant d'un syndrome des ovaires polykystiques. La capacité de la SST à diminuer les taux sériques de LH, et à diminuer les taux sériques d'hormone de croissance et d'IGF-I a été confirmée. Cet effet endocrinien ne s'est pas cependant pas accompagné d'un impact significatif sur la croissance folliculaire induite par l'administration de FSH (Lidor, A. et coll., *Gynecol. Endocrinol.* (1998), 12(2), 97-101; van der Meer, M. et coll., *Hum. Reprod.* (1998), 13(6), 1465-1469). En résumé, il a été rapporté à ce jour un effet marginal de la SST sur la sécrétion hypophysaire de LH et sur la production de progestérone par les cellules de la granulosa des follicules pré-ovulatoires.

Les Demandereuses ont maintenant découvert de façon surprenante que la SST et ses analogues ont la capacité d'inhiber le passage des follicules d'un stade quiescent à un stade de croissance et que cette faculté ouvrirait à ces composés de nouvelles utilisations thérapeutiques.

L'intérêt de cette découverte réside en premier lieu dans l'opportunité d'utiliser la SST ou un analogue agoniste de la SST pour préparer un médicament destiné à diminuer, voire inhiber l'entrée en croissance des follicules au stade quiescent. En second lieu, l'on pourra aussi utiliser un analogue antagoniste de ce peptide pour préparer un médicament destiné à accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents.

Il existe en effet un ensemble de situations cliniques pour lesquelles il serait médicalement souhaitable pour la patiente de ralentir l'utilisation de la réserve ovarienne afin de différer l'épuisement de cette dernière et donc de préserver la fonction ovarienne et la fertilité. Ces situations sont typiquement, et de manière non exclusive,

5 les patientes à risque de ménopause précoce. Il est en effet bien connu que certaines patientes présentent un épuisement prématûre de leur capital folliculaire. La ménopause survient alors avant l'âge de 40 ans et parfois même avant l'âge de trente ans. Il est souvent possible de prévoir cette ménopause précoce sur la base d'antécédents familiaux, ou d'anomalies génétiques telles que le syndrome de Turner (complet ou

10 partiel). Dans cette situation, l'administration de SST ou d'un de ses analogues agonistes sera préventive et aura pour but de ralentir l'entrée en croissance des follicules quiescents.

Il en est de même pour les patientes présentant une difficulté à concevoir et dont l'âge chronologique ou l'âge biologique de leurs ovaires correspond à la période 15 d'accélération de la mobilisation des follicules quiescents : ralentir cet épuisement du capital folliculaire devrait permettre d'augmenter l'efficacité des traitements et l'opportunité d'obtenir une grossesse.

Une autre situation clinique pouvant bénéficier d'un traitement par la SST ou par un de ses analogues agonistes est la greffe (préférablement autologue) d'ovaire ou de 20 fragments d'ovaire. Dans ce contexte, la reprise de la fonction ovarienne est souvent transitoire et s'accompagne d'une épuisement précoce du nombre de follicules primordiaux (Baird, D.T. et coll., *Endocrinology* (1999), **140**, 462-471). Il a en effet été démontré que, lors de la transplantation, les cellules de la granulosa des follicules en croissance sont plus disposées à entreprendre un phénomène d'apoptose que celle des follicules primordiaux (Liu, J. et coll., *Hum. Reprod.* (2002), **17**, 605-611). De plus, le prélèvement de tissu ovarien et leur fragmentation entraînent une mobilisation massive et rapide des follicules primordiaux vers un stade de follicules primaires tardifs (cf. Wandji S-A, et al., *Hum. Reprod.* (1997), **12**, 1993-2001; cf. également le groupe 25 contrôle de l'exemple de la présente demande).

30 Dans le cadre de cette application, des analogues agonistes de la somatostatine (ou la somatostatine) pourront être ajoutés aux divers milieux de prélèvement, lavage, conservation, congélation et décongélation du tissu ovarien en vue de greffes. L'invention concerne donc également les milieux correspondants comprenant un analogue agoniste de la somatostatine. Elle concerne de même l'utilisation d'un 35 analogue agoniste de la somatostatine comme adjuvant protecteur pour les milieux de prélèvement, lavage, conservation, congélation et décongélation du tissu ovarien.

Par ailleurs, l'utilisation *in vitro* de somatostatine ou d'analogues agonistes de la somatostatine pourra également être utile dans le domaine des analyses toxicologiques et dans la production *in vitro* d'ovocytes matures à partir de tissu ovarien frais ou congelé. Pour les premières, lors de tests de l'effet de nouvelles entités chimiques sur les follicules ovariens et leur croissance, l'ajout à l'échantillon folliculaire d'un analogue agoniste de la somatostatine permettra de ralentir la croissance folliculaire et ainsi d'observer plus facilement un effet éventuel d'accélération de ladite croissance occasionné par lesdites nouvelles entités chimiques. L'ajout d'antagoniste de la somatostatine permettra de mobiliser la réserve folliculaire vers les phases de croissance et de mieux évaluer l'impact de nouvelles entités chimiques sur ce phénomène. Pour la production *in vivo* d'ovocytes matures, l'ajout à l'échantillon folliculaire d'un analogue agoniste de la somatostatine permettra de ralentir la croissance folliculaire durant la phase initiale de mise en culture. L'ajout d'antagoniste de la somatostatine dans un second temps permettra de mobiliser la réserve folliculaire vers les phases de croissance permettant l'obtention d'un nombre supérieur de follicules matures et donc d'ovocytes fertilisables.

L'utilisation d'analogues agonistes de la somatostatine (ou la somatostatine) chez des patientes ayant des ovaires polykystiques présenterait également un intérêt. En effet, de nombreuses observations suggèrent que les ovaires polykystiques possèdent une population folliculaire anormalement élevée (cf. Hughesdon, *Obstet. Gynecol. Surv.* (1982), 37(2), 59-77). La production d'androgènes en excès par ces follicules en surnombre pourrait être à l'origine des désordres métaboliques et endocriniens observés chez ces patientes. De plus, une diminution significative de cette population folliculaire par résection ovarienne, cautérisation ou ultra-violets, constitue l'une des thérapeutiques les plus efficaces puisqu'elle permet aux patientes d'ovuler à environ 80% et de devenir enceintes à 75% en taux cumulé sur 18 mois. Ainsi, l'administration régulière d'un analogue agoniste de la somatostatine (ou de somatostatine) devrait entraîner une diminution du nombre de follicules en croissance et donc des follicules antraux surnuméraires producteurs d'androgènes ayant pour conséquence la reprise de cycles ovulatoires fertiles de façon transitoire ou permanente.

Par ailleurs, l'utilisation d'analogues agonistes de la somatostatine (ou de somatostatine) chez des patientes sur le point de subir, subissant ou ayant subi une chimiothérapie ou une irradiation (à visée thérapeutique ou autre) réduira le risque de ménopause précoce en prévenant la mobilisation accélérée de la réserve folliculaire qui la rendrait plus sensible aux agents de la chimiothérapie ou aux rayonnements ionisants.

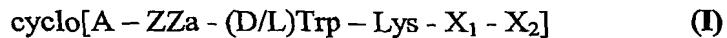
D'autres applications peuvent encore être envisagées, en particulier dans le domaine vétérinaire. L'invention pourrait être mise au service de la sauvegarde des espèces, l'utilisation d'analogues agonistes de la somatostatine (ou de somatostatine) permettant de préserver la réserve ovarienne des femelles. De même, des analogues antagonistes de la somatostatine peuvent être utilisés dans le cadre de fécondations *in vitro* ou *in vivo* chez animaux de haute valeur commerciale. De tels animaux de haute valeur commerciale peuvent notamment être des chevaux, des bovins, des ovins ou des caprins ; il peut également s'agir d'animaux d'origine transgénique.

En dehors des pathologies évoquées précédemment, un ralentissement systématique de l'épuisement de la réserve ovarienne pourrait être envisagé chez la femme ne souffrant d'aucun dysfonctionnement ovarien. Dans les pays industrialisés, l'allongement continu de l'espérance de vie (actuellement environ 83 ans en France) s'accompagne d'un allongement de la période post-ménopausique et des troubles qui y sont associés : cardiopathies, ostéoporose, vieillissement cutané, etc. Des doutes apparaissent quant à l'innocuité à long terme des traitements hormonaux substitutifs de la ménopause. En conséquence, une alternative élégante consisterait à décaler l'âge de survenue de la ménopause. Cela réduirait d'autant la période postménopausique et les risques associés. Ce décalage ne signifierait pas pour autant que la fertilité pourrait être maintenue jusqu'à 60 ans et plus. En effet de nombreux travaux suggèrent que la fonction ovarienne est maintenue tant qu'un nombre minimum de follicules de la réserve est maintenu, et qu'en dépit d'une fonction ovarienne "normale" (taux de stéroïdes peu affectés), les possibilités de grossesse sont extrêmement faibles.

Dans les situations où l'on souhaite ralentir l'utilisation de la réserve ovarienne, on utilisera selon l'invention la somatostatine naturelle (SST14 ou SST28), ou, de préférence, un analogue agoniste de la somatostatine (naturel ou synthétique). L'analogue agoniste de la somatostatine peut être un polypeptide cyclique ou non cyclique, une protéine de fusion ou de recombinaison, une entité chimique non peptidique (i.e. peptidomimétique) ou encore un peptide « *SS-like* » tel que la corticotstatine. Les analogues agonistes à utiliser devront présenter une haute affinité pour le récepteur SST et induire une activité fonctionnelle de celui-ci telle que l'inhibition de la sécrétion d'hormone de croissance par des cellules somatotropes de l'hypophyse et/ou l'inhibition de la prolifération *in vitro* de cellules d'adénome hypophysaire. De préférence, l'analogue agoniste de la somatostatine aura une haute affinité pour l'ensemble ou au moins 2 ou 3 des sous types de récepteurs de la SST ou alors une affinité privilégiée pour au moins l'un des sous-types 1, 2, 3, 4 et 5 (par exemple pour le sous-type 2).

Des analogues agonistes de la somatostatine ont été décrits notamment dans la demande de brevet PCT WO 01/00676 ou WO 98/08528 ou encore dans les brevets US 6,387,932, US 6,268,342, US 6,057,338, US 6,025,372.

Selon une variante particulière de l'invention, les analogues agonistes de la somatostatine seront des composés de formule générale (I)

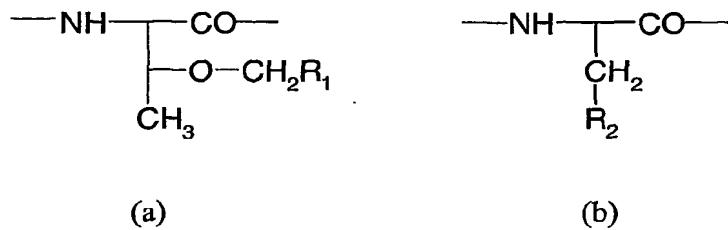


1            2            3            4            5            6

dans laquelle :

$X_1$  est un radical de formule (a) ou (b)

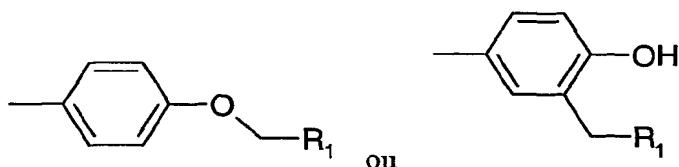
10



15

$R_1$  représentant indépendamment à chaque fois qu'il intervient un radical phényle éventuellement substitué dans lequel les substituants éventuels sont choisis indépendamment parmi un atome halogène et les radicaux méthyle, éthyle, méthoxy et éthoxy,

$R_2$  représentant  $-Z_1\text{-CH}_2\text{-R}_1$ ,  $-\text{CH}_2\text{-CO-O-CH}_2\text{-R}_1$ ,

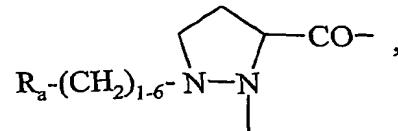
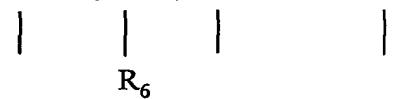
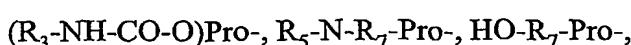


$Z_1$  étant O ou S ;

20

$X_2$  est un  $\alpha$ -aminoacide ayant un résidu aromatique sur la chaîne latérale  $C_\alpha$ , ou une unité acide aminé choisie parmi Dab, Dpr, Dpm, His, (Bzl)HyPro, thiényl-Ala, cyclohexyl-Ala et t-butyl-Ala ;

A est un résidu divalent choisi parmi Pro,



5 R<sub>3</sub> est NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>-C<sub>2-6</sub>alkylène, guanidino-C<sub>2-6</sub>alkylène ou C<sub>2-6</sub>alkylène-COOH, R<sub>3a</sub> est H, C<sub>1-4</sub>alkyle ou a indépendamment l'une des significations données pour R<sub>3</sub>, R<sub>3b</sub> est H ou C<sub>1-4</sub> alkyle, R<sub>a</sub> est OH ou NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, R<sub>b</sub> est -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- ou -CH(CH<sub>3</sub>)-, R<sub>4</sub> est H ou CH<sub>3</sub>, R<sub>4a</sub> est benzyle éventuellement substitué sur le cycle aromatique, chacun de R<sub>5</sub> et R<sub>6</sub> est indépendamment H, C<sub>1-4</sub>alkyle,  $\omega$ -amino-C<sub>1-4</sub>alkylène,  $\omega$ -hydroxy-C<sub>1-4</sub>alkylène ou acyle, R<sub>7</sub> est une liaison directe ou C<sub>1-6</sub>alkylène, chacun de R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub> est indépendamment H, C<sub>1-4</sub>alkyle,  $\omega$ -hydroxy-C<sub>2-4</sub>alkylène, acyle ou CH<sub>2</sub>OH-(CHOH)<sub>c</sub>-CH<sub>2</sub>- dans lequel c est 0, 1, 2, 3 ou 4, ou R<sub>8</sub> et R<sub>9</sub> forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont attachés un groupe hétérocyclique qui peut comprendre un hétéroatome supplémentaire, et R<sub>11</sub> est benzyle éventuellement substitué sur le cycle aromatique, -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-OH, CH<sub>3</sub>-CH(OH)- ou -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-5</sub>-NR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>, et ZZ<sub>a</sub> est une unité  $\alpha$ -aminoacide naturelle ou non naturelle ;

10

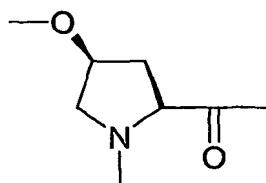
15

étant entendu que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> et Lys ont chacun la configuration L ;

ou bien seront des sels pharmaceutiquement acceptables ou des formes protégées de composés de formule générale (I).

20 ZZ<sub>a</sub> peut avoir une configuration D ou L. ZZ<sub>a</sub> peut être par exemple Thr, Ser, Ala, Val, Ile, Leu, Nle, His, Arg, Lys, Nal, Pal, Tyr, Trp, Phe substitué sur le noyau aromatique ou N<sup>a</sup>-benzyl-Gly. Lorsque ZZ<sub>a</sub> est Phe, son noyau benzénique peut être par exemple substitué par NH<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub> ou un atome halogène, de préférence en position *para*. Lorsque ZZ<sub>a</sub> est Phe, son noyau benzénique est de préférence non substitué.

25 Lorsque A comprend un résidu aminoacide Pro, tout substituant présent sur le cycle proline, par exemple R<sub>3</sub>-NH-CO-O- etc., est de préférence en position 4. De tels résidus proline substitués peuvent se présenter dans la forme *cis*, par exemple



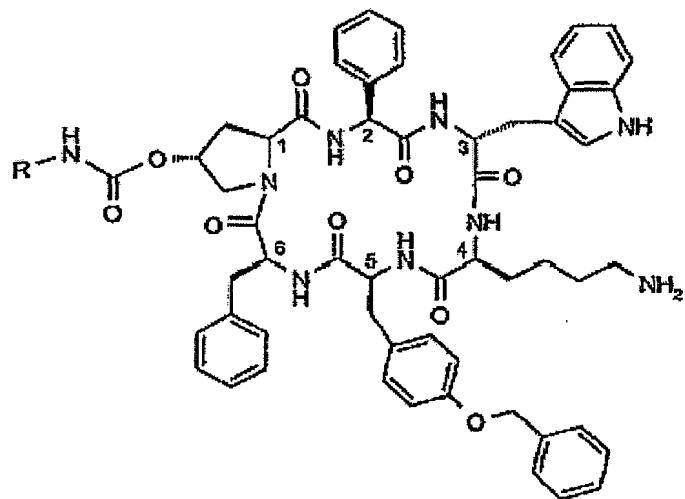
comme dans la forme *trans* form. Chaque isomère géométrique individuellement ainsi que des mélanges de ces isomères sont concernés par les utilisations selon l'invention.

Lorsque A est  $(NR_8R_9-C_{2-6}\text{alkylène}-NH-CO-O)Pro-$  dans lequel  $NR_8R_9$  forme un

5 groupe hétérocyclique, ledit groupe peut être aromatique ou saturé et peut comprendre un atome d'azote ou un atome d'azote et un second hétéroatome choisi parmi l'azote et l'oxygène. De préférence, le groupe hétérocyclique est par exemple pyridyle ou morpholino. Le radical  $C_{2-6}\text{alkylène}$  dans ce résidu est de préférence  $-CH_2-CH_2-$ .

10 Un groupe acyle tel que  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_8$  et  $R_9$  dans A peut être par exemple un groupe  $R_{12}CO-$  dans lequel  $R_{12}$  est H,  $C_{1-4}\text{alkyle}$ ,  $C_{2-4}\text{alkényle}$ ,  $C_{3-6}\text{cycloalkyle}$  ou benzyle, et de méthyle ou éthyle. Lorsque  $R_{4a}$  ou  $R_{11}$  dans A est benzyle substitué sur le noyau aromatique, le noyau benzénique peut être substitué comme indiqué ci-dessus pour  $ZZ_a$ .

Selon une variante préférée de l'invention, les analogues agonistes de la somatostatine seront des composés de formule générale (II)



(II)

15 dans laquelle R est  $NR_{10}R_{11}-C_{2-6}\text{alkylène}$  ou guanidine- $C_{2-6}\text{alkylène}$ , et chacun de  $R_{10}$  et  $R_{11}$  est indépendamment H ou  $C_{1-4}\text{alkyle}$

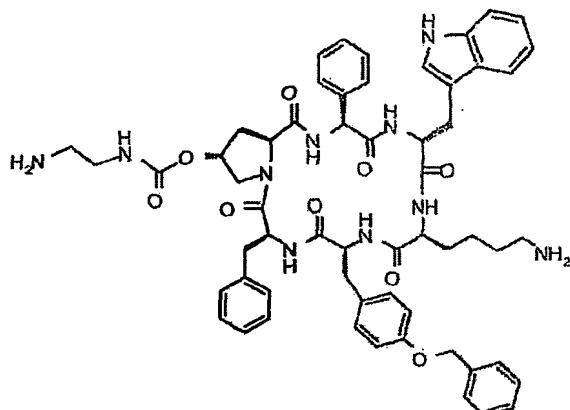
ou bien seront des sels pharmaceutiquement acceptables ou des formes protégées de composés de formule générale (II).

De préférence, R sera NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>-C<sub>2-6</sub>alkylène. Les composés préférés de formule générale (II) sont ceux tels que R est 2-aminoéthyle (et en particulier le peptide 5 SOM 230 de formule cyclo[ {4-(NH<sub>2</sub>-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-NH-CO-O-)}Pro]-Phg-DTrp-Lys-Tyr(4-Bzl)-Phe] dont la structure est reproduite plus loin).

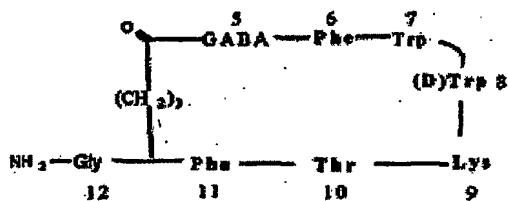
Par « forme protégée » d'un composé de formule générale (I) ou (II), on entend dans la présente demande un analogue de la somatostatine dans lequel au moins l'un des groupes amino est protégé et dont la déprotection (qui de préférence s'effectue d'elle-même en milieu physiologique) conduit à un composé de formule générale (I) ou (II). Des groupes protecteurs adéquats pour groupes amino sont par exemple ceux décrits dans *Protective Groups in Organic Synthesis*, T.W. Greene, J. Wiley & Sons NY (1981), 219-287. Un exemple de tel groupe protecteur pour un groupe amino est le groupe acétyle.

15 Parmi les analogues agonistes de la somatostatine utilisables selon l'invention, on peut citer plus particulièrement le lanréotide, l'octréotide, le vapréotide, le SOM 230 (voir structure ci-après), le MK-678 (peptide de structure cyclo(N-Me-Ala-Tyr-D-Trp-Lys-Val-Phe)), le BIM-23190 (peptide de structure N-hydroxyéthylpipérazinyl-acétyl-D-Phe-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub>), le BIM-23197 (peptide de structure 20 Hepes-D-Phe-cyclo[Cys-Tyr-D-Trp-Lys-Abu-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub> dans laquelle Abu représente l'acide aminobutyrique), le BIM-23268 (peptide de structure cyclo[Cys-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe-Cys]-NH<sub>2</sub>), le PTR-3173 (voir structure ci-après), le TT-232 (de structure D-Phe-cyclo[Cys-D-Trp-Lys-Cys]-Thr-NH<sub>2</sub>), et leurs 25 sels pharmaceutiquement acceptables ; on peut également citer le peptide synthétique de formule c[Tic-Tyr-DTrp-Lys-Abu-Phe] et ses sels pharmaceutiquement acceptables ; on peut enfin citer le peptide KE 108 de formule Tyr<sup>0</sup>-(cyclo-D-Dab-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys-Thr-Phe) décrit notamment dans Reubi et coll., *Eur. J. Pharmacol.* (2002), 456, 45-49. On préférera tout particulièrement employer le lanréotide, l'octréotide ou un de 30 leurs sels pharmaceutiquement acceptables, et plus particulièrement le lanréotide ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

- 11 -



SOM 230



PTR 3173

De façon analogue aux composés de formule générale (I) ou (II), les peptides susmentionnés pourront également se présenter sous une forme protégée. Le définition de la forme protégée donnée plus haut pour les composés de formules générales (I) ou (II) est applicable *mutatis mutandis*.

- 5 Selon une variante préférée de l'invention, les patientes auxquelles sera destiné le médicament à base de somatostatine ou d'analogue agoniste de la somatostatine mentionné précédemment seront des femmes ayant un facteur de risque de ménopause précoce, et notamment des femmes ayant des antécédents familiaux de ménopause précoce. Selon une variante particulière de l'invention, les patientes auxquelles sera destiné le médicament à base de somatostatine ou d'analogue agoniste de la somatostatine mentionné précédemment seront des femmes atteintes d'une micro-délétion du chromosome X ou d'un syndrome de Turner partiel.
- 10

Le second intérêt de la découverte évoquée précédemment réside dans l'opportunité de préparer un médicament à base d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents. En effet, un couple sur six parmi ceux qui souhaitent une grossesse présente une difficulté à concevoir. Bien que les causes soient multiples, deux types de traitement ont émergé et sont utilisés de façon régulière en médecine humaine pour le traitement de la stérilité. Ces traitements, aussi

appelés "Assistance Médicale à la Procréation" (AMP), consistent d'abord à induire la croissance simultanée de plusieurs follicules pré-ovulatoires. Ceci permet d'obtenir plusieurs ovocytes matures, et donc plusieurs embryons, et ainsi d'augmenter les chances de conception. Ceci est réalisé par l'administration d'un ou plusieurs 5 médicaments stimulant la sécrétion hypophysaire des gonadotrophines (FSH et LH), tel qu'un anti-oestrogène (par exemple le citrate de clomiphène ou le tamoxifène) ou un inhibiteur de l'aromatase (par exemple le létrazole, l'anastrazole ou l'exémestane). La croissance simultanée de plusieurs follicules pré-ovulatoires peut aussi être induite par l'administration d'une préparation de FSH humaine (extractive ou recombinante) 10 associée ou non à de la LH. Lorsque les follicules ont atteint une taille pré-ovulatoire, selon la cause de la stérilité, deux options de traitement existent. La première est de réaliser une insémination intra-utérine (IIU) et la seconde est de prélever les ovocytes dans l'ovaire par aspiration des follicules (entre 5 et 15 ovocytes) et de réaliser une insémination au laboratoire (*in vitro*), soit par simple co-incubation des ovocytes avec 15 les spermatozoïdes du partenaire (FIV) ou par micro-injection d'un spermatozoïde directement dans l'ovocyte (ICSI). L'obtention de plusieurs ovocytes matures est critique pour optimiser les taux de succès (taux de grossesse) obtenus par ces traitements ; or chez certaines femmes, malgré une stimulation ovarienne appropriée, le nombre d'ovocytes obtenus est faible voire même égal à un. Cette difficulté à répondre au 20 traitement stimulant résulte du nombre restreint de follicules en croissance présents dans les ovaires de ces patientes. Il est donc d'un intérêt thérapeutique important de pouvoir mobiliser des follicules de la réserve ovarienne et de les faire entrer en phase de croissance.

Un autre objet de la présente invention consiste en l'utilisation d'un analogue 25 antagoniste de la somatostatine pour préparer un médicament destiné à accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents chez la femme non ménopausée.

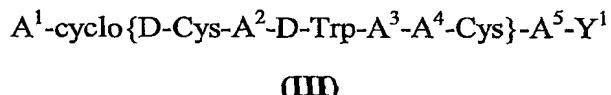
L'administration d'un tel médicament pendant une période de 1 à 12 mois chez la femme conduira à une augmentation du nombre de follicules en phase de croissance et donc susceptibles d'être stimulés par les traitements standard pour atteindre le stade de 30 follicules pré-ovulatoires.

Une autre application de la capacité des analogues antagonistes de la somatostatine d'induire la croissance folliculaire précoce est leur utilisation *in vitro* dans des cultures de follicules pour la production d'ovocytes matures destinés à la fécondation. L'analogue antagoniste de la somatostatine sera ajouté au milieu de culture utilisé pour soutenir le développement folliculaire *in vitro*. L'invention concerne donc également les 35 milieux correspondants comprenant un analogue antagoniste de la somatostatine. Par

ailleurs, la capacité des analogues antagonistes de la somatostatine d'induire la croissance folliculaire précoce peut aussi être utilisée dans le domaine des analyses toxicologiques. En particulier, lors de tests de l'effet de nouvelles entités chimiques sur la croissance folliculaire, l'ajout à l'échantillon folliculaire d'un analogue antagoniste 5 de la somatostatine permettra d'accélérer la croissance folliculaire et ainsi d'observer plus facilement un effet éventuel de ralentissement de ladite croissance occasionné par lesdites nouvelles entités chimiques.

L'analogue antagoniste de la somatostatine peut être un polypeptide cyclique ou non cyclique, une protéine de fusion ou de recombinaison, une entité chimique non 10 peptidique (i.e. peptidomimétique) ou encore un peptide « *SS-like* » tel que la corticostatine. Les analogues antagonistes à utiliser devront présenter une haute affinité pour le récepteur SST et inhiber l'activité fonctionnelle de SST14 ou SST28 telle que l'inhibition de la sécrétion d'hormone de croissance par des cellules somatotropes de l'hypophyse et/ou l'inhibition de la prolifération *in vitro* de cellules d'adénome 15 hypophysaire. De préférence, l'analogue antagoniste de la somatostatine aura une haute affinité pour l'ensemble ou au moins 2 ou 3 des sous types de récepteurs de la SST ou alors une affinité privilégiée pour au moins 1'un des sous-types 1, 2, 3, 4 et 5 (par exemple pour le sous-type 2).

Un analogue antagoniste de la somatostatine utilisable pour préparer selon l'invention 20 pourra par exemple être un peptide de formule générale



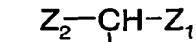
dans laquelle :

$A^1$  est un  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ;  
 25  $A^2$  est un  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ;  
 $A^3$  est Dab, Dap, Lys ou Orn ;  
 $A^4$  est  $\beta$ -Hydroxyvaline, Ser, Hser, ou Thr ;  
 $A^5$  est un D- ou L-  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ; et  
 $Y^1$  est OH, NH<sub>2</sub> ou NHR<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> étant (C<sub>1-6</sub>)alkyle ;  
 30 chaque  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué étant éventuellement substitué avec un ou des substituants choisis indépendamment parmi le groupe composé d'un atome halogène et des groupes NO<sub>2</sub>, OH, CN,

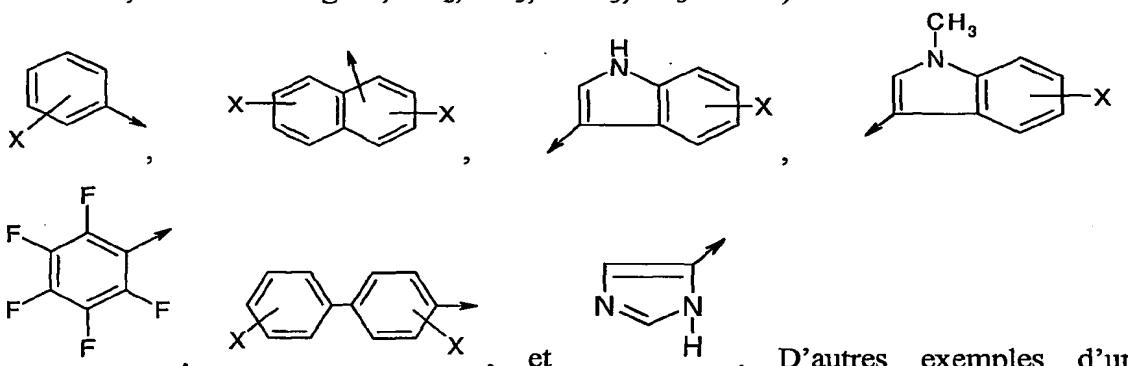
(C<sub>1-6</sub>)alkyl, (C<sub>2-6</sub>)alkényle, (C<sub>2-6</sub>)alkynyle, (C<sub>1-6</sub>)alkoxy, Bzl, O-Bzl et NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, R<sup>9</sup> et R<sup>10</sup> étant chacun indépendamment H, O, ou (C<sub>1-6</sub>) alkyle; et

5 chaque atome d'azote de liaison amide peptidique et le groupe amino de A<sup>1</sup> étant éventuellement substitué avec un groupe méthyle, étant entendu qu'il y a au moins un tel groupe méthyle dans un peptide de formule générale (III) ;  
 ou un sel pharmaceutiquement acceptable d'un peptide de formule générale (III).

Par "α-aminoacide aromatique", on entend un résidu aminoacide de formule



10 dans laquelle Z<sub>1</sub> est un radical contenant un cycle aromatique et Z<sub>2</sub> est un atome d'hydrogène ou un radical contenant un cycle aromatique. Des exemples de tels radicaux contenant un cycle aromatique incluent, mais ne sont pas limités à, un cycle benzénique ou pyridine et les structures suivantes avec ou sans un ou des substituants X sur le cycle aromatique (X étant, indépendamment à chaque fois qu'il intervient, un atome halogène, NO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, OCH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub> ou OH) :



15 D'autres exemples d'un "α-aminoacide aromatique" selon l'invention sont des His substituées, telles que MeHis, His (τ-Me) ou His (π-Me).

D'autres analogues antagonistes de la somatostatine ont été décrits notamment dans les demandes de brevet PCT WO 98/08528, WO 98/08529, WO 98/24807, WO 98/44921, 20 WO 98/44922, WO 98/45285 et WO 99/22735, ou encore dans les brevets US 6,387,932, US 6,262,229, US 6,063,796, US 6,057,338, US 6,025,372, US 5,925,618, US 5,846,934 et US 4,508,711.

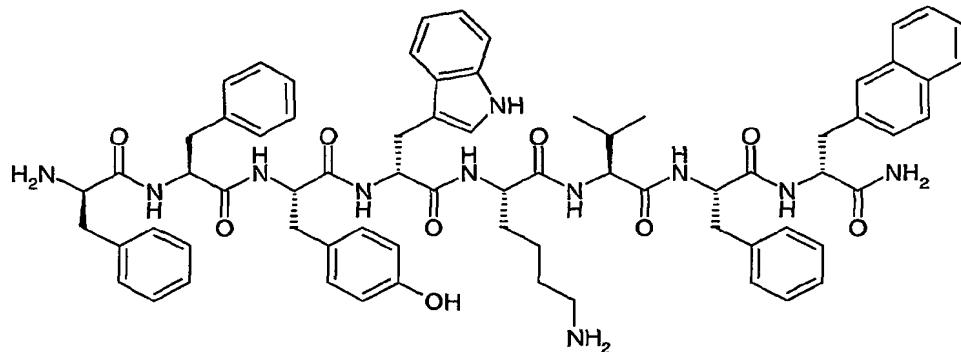
Parmi les analogues antagonistes de la somatostatine utilisables selon l'invention et leurs sels pharmaceutiquement acceptables, on pourra citer plus particulièrement :

25 ♦ les peptides de formule générale (III) suivants :

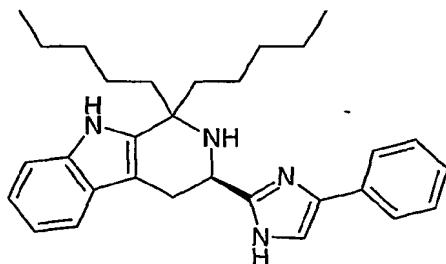
- Cpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Cys]-D-Trp-NH<sub>2</sub>;

- Cpa-cyclo[D-Cys-Tyr-D-Trp- N-Me-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH<sub>2</sub> ;
- Cpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp- N-Me-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH<sub>2</sub> ;
- ❖ le peptide connu sous le nom de code AC-178,335 (de structure acétyl-D-His-D-Phe-D-Ile-D-Arg-D-Trp-D-Phe-NH<sub>2</sub>) ;
- 5 ❖ l'octapeptide connu sous le nom de code ODN-8 (cf. Fig. 1 de *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), 97(25), 13973–13978) ;
- ❖ le peptide connu sous le nom de code SB-710411 (de structure Cpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide) ;
- 10 ❖ le peptide connu sous le nom de code BIM-23056 (de structure représentée ci-après) ;
- ❖ le composé connu sous le nom de code BN-81674 (de structure représentée ci-après) ;
- ❖ le composé connu sous le nom de code SRA-880 (de structure représentée ci-après) ;

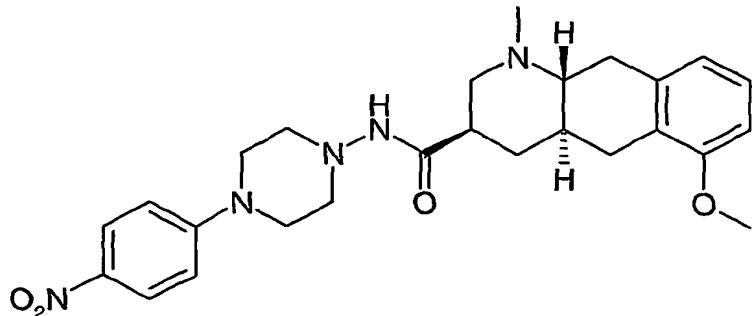
15 et les sels pharmaceutiquement acceptables de ces derniers.



BIM 23056



BN-81674



SRA-880

De façon analogue aux composés de formule générale (I) ou (II), les peptides susmentionnés (y compris ceux répondant à de formule générale (III)) pourront également se présenter sous une forme protégée. Le définition de la forme protégée donnée plus haut pour les composés de formules générales (I) ou (II) est applicable 5 *mutatis mutandis*.

Par analogue agoniste de la somatostatine, on entend dans la présente demande un composé pour lequel la dose effective  $DE_{50}$  déterminée au test de l'effet agoniste décrit plus loin est inférieure ou égale à 1  $\mu\text{M}$  pour au moins l'un des sous-récepteurs de la somatostatine.

10 Par analogue antagoniste de la somatostatine, on entend dans la présente demande un composé pour lequel la dose effective  $DE_{50}$  déterminée au test de l'effet antagoniste décrit plus loin est inférieure ou égale à 1  $\mu\text{M}$  pour au moins l'un des sous-récepteurs de la somatostatine.

15 Par sel pharmaceutiquement acceptable, on entend notamment dans la présente demande des sels d'addition avec des acides inorganiques tels que chlorhydrate, bromhydrate, iodhydrate, sulfate, phosphate, diphosphate et nitrate ou avec des acides organiques tels que acétate, maléate, fumarate, tartrate, succinate, citrate, lactate, méthanesulfonate, p-tolènesulfonate, pamoate et stéarate. Entrent également dans le 20 champ de la présente invention, lorsqu'ils sont utilisables, les sels formés à partir de bases telles que l'hydroxyde de sodium ou de potassium. Pour d'autres exemples de sels pharmaceutiquement acceptables, on peut se référer à "Salt selection for basic drugs", *Int. J. Pharm.* (1986), 33, 201-217.

25 Selon la présente invention, les préparations pharmaceutiques contenant de la somatostatine ou un de ses analogues agonistes ou antagonistes applicables à cette invention pourront être administrée par voie parentérale (sous cutanée, intra-musculaire, intra-péritonéale, intra-veineuse, ou en implant), par voie orale, vaginale, rectale, nasale,

sublinguale ou transdermale. La voie vaginale sera préférée car elle permet de délivrer des concentrations effectives du principe actif au niveau ovarien tout en minimisant l'exposition systémique. La somatostatine ou l'analogue de la somatostatine utilisé sera formulé avec les excipients nécessaires et connus de l'homme de l'art, pour permettre 5 une administration efficace et reproductible pour chaque voie d'administration.

La dose d'un produit selon la présente invention, à prévoir pour le traitement des maladies ou troubles mentionnés ci-dessus, varie suivant le mode d'administration, l'âge et le poids corporel du sujet à traiter ainsi que l'état de ce dernier, et il en sera décidé en définitive par le médecin ou le vétérinaire traitant. Une telle quantité déterminée par le 10 médecin ou le vétérinaire traitant est appelée ici "quantité thérapeutiquement efficace".

Les situations typiques suivantes pour une utilisation selon l'invention pourraient toutefois être envisagées :

- ❖ Une patiente d'environ 20 à 25 ans (par exemple) présente un syndrome de Turner partiel par micro-délétion d'un chromosome X. Sa fonction ovarienne est apparemment normale avec des cycles ovulatoires réguliers. Son taux sérique de FSH est légèrement élevé durant la période de transition lutéo-folliculaire (par exemple FSH = environ 9,2 UI/litre). L'échographie ovarienne réalisée par voie trans-vaginale montre des ovaires de volume normaux avec un nombre de follicules antraux légèrement diminué. Considérant son risque élevé de présenter une 15 ménopause précoce, la patiente est traitée avec de l'acétate de lanréotide à une dose de 120 mg/mois (Somatuline® Autogel® 120 mg, Beaufour Ipsen Pharma, France). Le traitement est interrompu après plusieurs années lorsque la patiente souhaite concevoir.
- ❖ Une patiente d'environ 35 à 40 ans présente une stérilité primaire depuis plusieurs 20 années. Le bilan du couple conclu en une stérilité d'origine tubaire, résultant très probablement d'un antécédent de péritonite. Les cycles menstruels sont ovulatoires et le taux sérique de FSH est légèrement élevé durant la période de transition lutéo-folliculaire (par exemple FSH = environ 11,4 UI/L). L'échographie ovarienne réalisée par voie trans-vaginale montre des ovaires de volume légèrement diminué 25 avec un nombre de follicules antraux diminués (environ 3 par ovaire). Un diagnostic de diminution de la réserve ovarienne est posé. Un traitement par fécondation *in vitro* est recommandé et la patiente entreprend un traitement de stimulation ovarienne par injection quotidienne de 225 unités de FSH recombinante. Au 6<sup>e</sup> jour de stimulation, une échographie ovarienne montre un seul follicule en croissance de 30 14 mm dans l'ovaire droit. La dose de FSH est doublée et la patiente est revue 2 jours plus tard. Un seul follicule de 18 mm est observé, confirmant une diminution 35

de la réserve ovarienne. Le traitement est interrompu. Après retour d'un cycle spontané, un traitement par administration quotidienne d'un analogue antagoniste de la somatostatine est initié. Durant ce traitement, le nombre de follicules antraux présents dans chaque ovaire est estimé par échographie en début de chaque cycle menstruel. Après 4 mois de traitement, le nombre de follicules antraux est en moyenne d'environ 6 par ovaire et la FSH sérique a diminué. Une stimulation par FSH recombinante est initiée, un développement folliculaire multiple est obtenu, et une procédure de fécondation *in vitro* classique est effectuée.

5           ❖ Une patiente ayant un syndrome des ovaires polykystiques présente des règles très peu fréquentes, une absence d'ovulation, un poids excessif et des signes cutanés d'excès d'androgènes tels que acné et hirsutisme. A l'examen échographique du pelvis, l'endomètre est hyperplasique, les ovaires présentent un volume augmenté, un stroma augmenté, et plus de 10 follicules antraux par section ovarienne. Aucun follicule ne présente un diamètre supérieur à 10 mm. La patiente est traitée avec de l'acétate de lanréotide à une dose de 120 mg/mois (Somatuline<sup>®</sup> Autogel<sup>®</sup> 120 mg, Beaufour Ipsen Pharma, France). Après 3 mois de traitement, la patiente est réglée spontanément. Au 4<sup>e</sup> mois de traitement, l'échographie des ovaires indique une réduction du volume ovarien et du nombre de follicules antraux. Un follicule de 16 mm est observé. Pendant les 5<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> mois de traitement, la patiente est réglée régulièrement et sa courbe de température est biphasique, suggérant une ovulation. 10           Au 8<sup>e</sup> mois de traitement, la patiente n'est pas réglée et un test de grossesse est positif. Le traitement avec l'acétate de lanréotide est interrompu.

15           20

**Abréviations et définitions particulières utilisées dans la présente demande :**

25           Les abréviations des acides aminés courants sont en accord avec les recommandations IUPAC-IUB. Par ailleurs, les définitions pour certaines abréviations utilisées dans la présente demande sont comme suit :

Abu	=	acide $\alpha$ -aminobutyrique ;
Aib	=	acide $\alpha$ -aminoisobutyrique ;
$\beta$ -Ala	=	$\beta$ -alanine ;
30           Amp	=	4-amino-phénylalanine ;
Ava	=	acide 5-aminovalérique ;

	Bzl	=	benzyle ;
	Cha	=	cyclohexylalanine ;
	Cpa	=	3-(4-chlorophényl)alanine ;
	Dab	=	acide 2,4-diaminobutyrique ;
5	Dap	=	acide 2,3-diaminopropionique ;
	Dip	=	3,3'-diphénylalanine ;
	GABA	=	acide $\gamma$ -aminobutyrique ;
	HSer	=	homosérine ;
	1-Nal	=	3-(1-naphthyl)alanine ;
10	2-Nal	=	3-(2-naphthyl)alanine ;
	Nle	=	norleucine ;
	Nva	=	norvaline ;
	2-Pal	=	3-(2-pyridyl)alanine ;
	3-Pal	=	3-(3-pyridyl)alanine ;
15	4-Pal	=	3-(4-pyridyl)alanine ;
	Phg	=	-HN-CH(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> )-CO-
	Tfm	=	trifluorométhyle ;
	TfmA	=	4-trifluorométhylphényl-alanine ;
	Tic	=	acide 1,2,3,4-tétrahydroisoquinoline-3-carboxylique.
20	En outre, NMeLys représente la N-méthyl-lysine, dans laquelle l'azote de la liaison peptidique est méthylé (et non l'azote de la chaîne latérale de la lysine).		
	Enfin, Tyr(I) représente un résidu tyrosine iodé (par exemple 3-I-Tyr, 5-I-Tyr, 3,5-I-Tyr) dans lequel l'atome d'iode peut être un isotope radioactif, par exemple I <sub>125</sub> , I <sub>127</sub> ou I <sub>131</sub> .		
25	Par ailleurs, le terme "environ" fait référence à un intervalle autour de la valeur considérée. Tel qu'utilisé dans la présente demande, "environ X" signifie un intervalle de X moins 10% de X à X plus 10% de X, et de préférence un intervalle de X moins 5% de X à X plus 5% de X.		

**Préparation des peptides de formule générale (I) :**

Les peptides de formules générales (I) et (II) mentionnées ci-dessus et leur synthèse sont décrits entre autres dans les demandes de brevet PCT WO 97/01579 et WO 02/10192.

5 Les peptides de formule générale (III) mentionnés ci-dessus et leur synthèse sont décrits dans la demande de brevet PCT WO 02/072602.

10 A moins qu'ils ne soient définis d'une autre manière, tous les termes techniques et scientifiques utilisés ici ont la même signification que celle couramment comprise par un spécialiste ordinaire du domaine auquel appartient cette invention. De même, toutes les publications, demandes de brevets, tous les brevets et toutes autres références mentionnées ici sont incorporées par référence.

Les exemples suivants sont présentés pour illustrer les procédures ci-dessus et ne doit en aucun cas être considéré comme une limite à la portée de l'invention.

**EXEMPLES :**

15 **Exemple 1 :**

Des ovaires de brebis adultes sont collectés immédiatement après abattage. Les ovaires sont placés dans un milieu de transport d'organes sans sérum (X-vivo, Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA) à 10 °C et acheminé au laboratoire. Environ 1 h après le prélèvement, le cortex est isolé de la medulla puis fractionné en tranches de 2 mm d'épaisseur (1 cm<sup>2</sup>, poids moyen de 212 mg) après rinçage dans du X-vivo neuf. Les fragments de cortex sont cultivés en étuve sous 5% d'oxygène pendant 10 jours dans des boites à puits en présence de DMEM. Le milieu est changé tous les 2 jours.

20 Dans les fragments contrôles (incubées en l'absence de SST) les follicules primordiaux passent progressivement vers le stade de follicules en début de croissance (voir les Figures 1 et 2). L'addition de SST14 à des concentrations variant entre 10<sup>-9</sup> M et 10<sup>-6</sup> M

inhibe très significativement l'entrée des follicules primordiaux en croissance comme le montre le maintien au cours du temps du nombre de follicules primordiaux (cf. Figure 1) et l'absence d'augmentation du nombre de follicules primaires (cf. Figure 2).

5    **Exemple 2**

La procédure employée est la même que pour l'exemple 1, excepté que la somatostatine est remplacée par un de ses analogues agonistes, à savoir le peptide synthétique de formule c[Tic-Tyr-DTrp-Lys-Abu-Phe] (ci-après peptide AG<sub>1</sub>).

10   Dans les fragments contrôles (incubées en l'absence du peptide AG<sub>1</sub>) les follicules primordiaux passent progressivement vers le stade de follicules en début de croissance (cf. Figure 3). L'addition du peptide AG<sub>1</sub> à une concentration de 10<sup>-9</sup> M inhibe très significativement l'entrée des follicules primordiaux en croissance comme le montre le maintien au cours du temps du nombre de follicules primordiaux et l'absence d'augmentation du nombre de follicules primaires (cf. Figure 4).

15   **Exemple 3**

La procédure employée est la même que pour l'exemple 1, excepté que la somatostatine est remplacée par un de ses analogues antagonistes, à savoir le peptide synthétique de formule Cpa-c(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH<sub>2</sub> (ci-après peptide ANT<sub>1</sub>).

20   Dans les fragments contrôles (incubées en l'absence du peptide ANT<sub>1</sub>) les follicules primordiaux passent progressivement vers le stade de follicules en début de croissance (cf. Figure 3). L'on constate que l'addition du peptide ANT<sub>1</sub> à une concentration de 10<sup>-6</sup> M accentue l'entrée des follicules primordiaux en croissance (cf. Figure 5).

**Brève description des figures**

La **Figure 1** représente les proportions de follicules au repos au cours d'une période de 10 jours de culture de cortex ovarien de brebis en présence de somatostatine (SST14) ou non (contrôle). Ces proportions sont mesurées pour chaque échantillon testé au jour du début de l'expérience (J0), au 4<sup>e</sup> jour (J4), au 7<sup>e</sup> jour (J7) et au 10<sup>e</sup> jour (J10).

La **Figure 2** représente les proportions de follicules primaires au cours d'une période de 10 jours de culture de cortex ovarien de brebis en présence de somatostatine (SST14) ou non (contrôle). Ces proportions sont mesurées pour chaque échantillon testé au jour du début de l'expérience (J0), au 4<sup>e</sup> jour (J4), au 7<sup>e</sup> jour (J7) et au 10<sup>e</sup> jour (J10).

10 La **Figure 3** représente les proportions de follicules primordiaux, intermédiaires, primaires et secondaires au cours d'une période de 10 jours de culture de cortex ovarien de brebis en l'absence d'analogue agoniste ou antagoniste de la somatostatine. Ces proportions sont mesurées pour chaque échantillon testé au jour du début de l'expérience (J0), au 4<sup>e</sup> jour (J4), au 7<sup>e</sup> jour (J7) et au 10<sup>e</sup> jour (J10).

15 La **Figure 4** représente les proportions de follicules primordiaux, intermédiaires, primaires et secondaires au cours d'une période de 10 jours de culture de cortex ovarien de brebis en présence d'un analogue agoniste de la somatostatine, le peptide synthétique de formule c[Tic-Tyr-DTrp-Lys-Abu-Phe] (peptide AG<sub>1</sub>) ou non. Ces proportions sont mesurées pour chaque échantillon testé au jour du début de l'expérience (J0), au 4<sup>e</sup> jour (J4), au 7<sup>e</sup> jour (J7) et au 10<sup>e</sup> jour (J10).

20 La **Figure 5** représente les proportions de follicules primordiaux, intermédiaires, primaires et secondaires au cours d'une période de 10 jours de culture de cortex ovarien de brebis en présence d'un analogue antagoniste de la somatostatine, le peptide synthétique de formule Cpa-c(DCys-3-Pal-DTrp-NMeLys-Thr-Cys)-2-Nal-NH<sub>2</sub> (peptide ANT<sub>1</sub>). Ces proportions sont mesurées pour chaque échantillon testé au jour du début de l'expérience (J0), au 4<sup>e</sup> jour (J4), au 7<sup>e</sup> jour (J7) et au 10<sup>e</sup> jour (J10).

**Tests de détermination de l'effet agoniste ou antagoniste d'un analogue de la somatostatine**

*Inhibition de la production intracellulaire d'AMPc*

Des cellules CHO-K1 exprimant les sous-types de récepteurs de la somatostatine humaine (SRIF-14) sont cultivées dans des plaques à 24 puits dans un milieu RPMI 1640 contenant 10% de sérum foetal de veau. Le milieu est changé le jour précédent l'expérience.

Les cellules à raison de  $10^5$  cellules/puits sont lavées 2 fois avec 0,5 ml de nouveau milieu RPMI comprenant 0,2 % BSA complété par 0,5 mM de 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX) et incubées pendant environ 5 minutes à environ 37 °C. La production d'AMP cyclique est stimulée par l'addition de 1 mM de forskoline (FSK ; fournisseur : Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) pendant 15-30 minutes à environ 37 °C.

*Détermination de l'effet agoniste d'un analogue de la somatostatine*

15 L'effet agoniste d'un analogue de la somatostatine est mesuré par l'addition simultanée de FSK (1  $\mu$ M) et de l'analogue à tester ( $10^{-10}$  M à  $10^{-5}$  M).

Le milieu réactionnel est éliminé et 200 ml de HCl 0,1 N sont ajoutés. La quantité d'AMPc est mesurée par un test radioimmunologique (Kit FlashPlate SMP001A, New England Nuclear, Boston, USA).

20 *Détermination de l'effet antagoniste d'un analogue de la somatostatine*

L'effet antagoniste d'un analogue de la somatostatine est mesuré par l'addition simultanée de FSK (1  $\mu$ M) , SRIF-14 (1 à 10 nM) (fournisseur : Bachem, Torrence, CA, USA) et de l'analogue à tester ( $10^{-10}$  M à  $10^{-5}$  M).

Le milieu réactionnel est éliminé et 200 ml de HCl 0,1 N sont ajoutés. La quantité d'AMPc est mesurée par un test radioimmunologique (Kit FlashPlate SMP001A, New England Nuclear, Boston, USA).

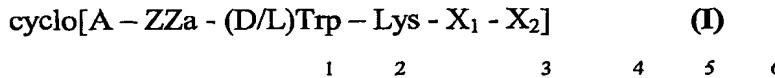
Revendications

1. Utilisation de la somatostatine ou d'un de ses analogues agonistes pour préparer un médicament destiné à réguler la réserve folliculaire ovarienne, et en particulier à diminuer l'épuisement de la réserve folliculaire ovarienne avec le temps, chez la femme 5 non ménopausée.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la somatostatine est utilisée pour préparer le médicament.

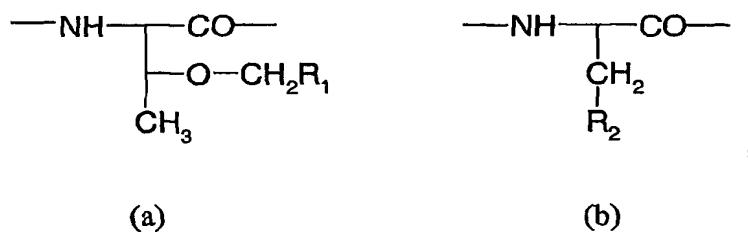
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'un analogue agoniste de la somatostatine est utilisé pour préparer le médicament.

10 4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'analogue agoniste de la somatostatine est un composé de formule générale (I)



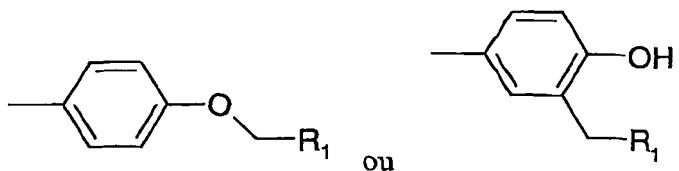
dans laquelle :

15 X<sub>1</sub> est un radical de formule (a) ou (b)



20 R<sub>1</sub> représentant indépendamment à chaque fois qu'il intervient un radical phényle éventuellement substitué dans lequel les substituants éventuels sont choisis indépendamment parmi un atome halogène et les radicaux méthyle, éthyle, méthoxy et éthoxy,

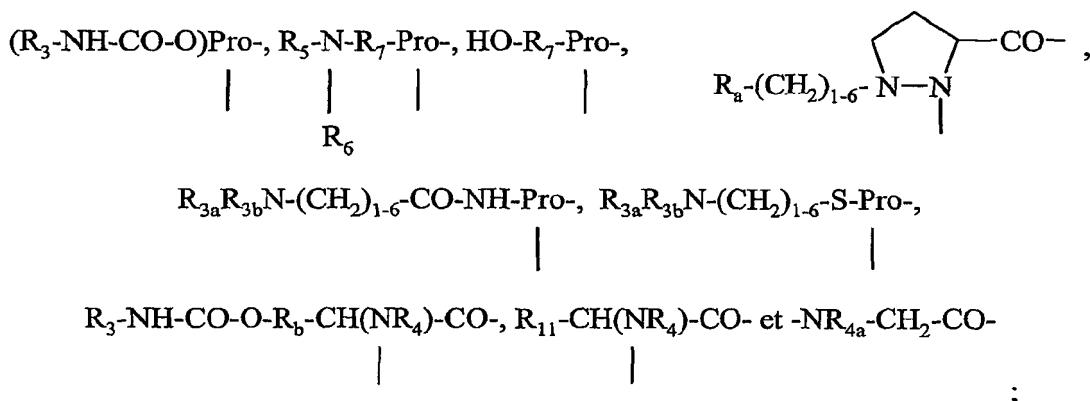
R<sub>2</sub> représentant —Z<sub>1</sub>—CH<sub>2</sub>—R<sub>1</sub>, —CH<sub>2</sub>—CO—O—CH<sub>2</sub>—R<sub>1</sub>,



$Z_1$  étant O ou S ;

5  $X_2$  est un  $\alpha$ -aminoacide ayant un résidu aromatique sur la chaîne latérale  $C_\alpha$ , ou une unité acide aminé choisie parmi Dab, Dpr, Dpm, His, (Bzl)HyPro, thiényl-Ala, cyclohexyl-Ala et t-butyl-Ala ;

A est un résidu divalent choisi parmi Pro,

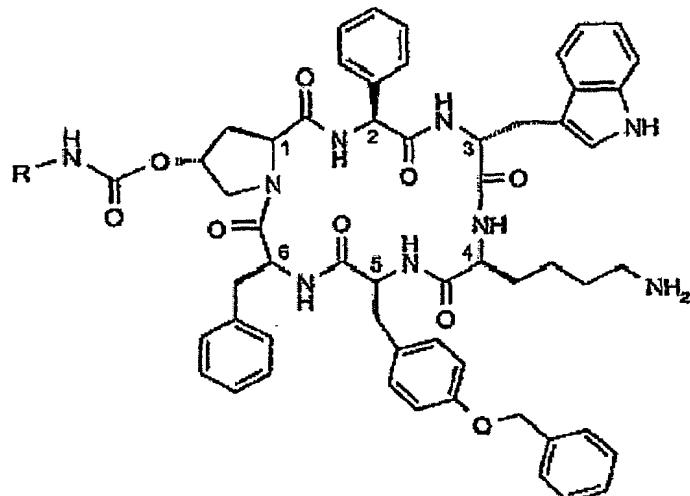


10  $R_3$  est  $\text{NR}_8\text{R}_9\text{-C}_{2-6}\text{alkylène}$ , guanidino- $\text{C}_{2-6}\text{alkylène}$  ou  $\text{C}_{2-6}\text{alkylène-COOH}$ ,  $R_{3a}$  est H,  $\text{C}_{1-4}\text{alkyle}$  ou a indépendamment l'une des significations données pour  $R_3$ ,  $R_{3b}$  est H ou  $\text{C}_{1-4}$  alkyle,  $R_a$  est OH ou  $\text{NR}_5\text{R}_6$ ,  $R_b$  est  $-(\text{CH}_2\text{)}_{1-3}\text{-}$  ou  $-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{-}$ ,  $R_4$  est H ou  $\text{CH}_3$ ,  $R_{4a}$  est benzyle éventuellement substitué sur le cycle aromatique, chacun de  $R_5$  et  $R_6$  est indépendamment H,  $\text{C}_{1-4}\text{alkyle}$ ,  $\omega\text{-amino-}\text{C}_{1-4}\text{alkylène}$ ,  $\omega\text{-hydroxy-}\text{C}_{1-4}\text{alkylène}$  ou acyle,  $R_7$  est une liaison directe ou  $\text{C}_{1-6}\text{alkylène}$ , chacun de  $R_8$  et  $R_9$  est indépendamment H,  $\text{C}_{1-4}\text{alkyle}$ ,  $\omega\text{-hydroxy-}\text{C}_{2-4}\text{alkylène}$ , acyle ou  $\text{CH}_2\text{OH-}(\text{CHOH})_c\text{-CH}_2\text{-}$  dans lequel c est 0, 1, 2, 3 ou 4, ou  $R_8$  et  $R_9$  forment ensemble avec l'atome d'azote auquel ils sont attachés un groupe hétérocyclique qui peut comprendre un hétéroatome supplémentaire, et  $R_{11}$  est benzyle éventuellement substitué sur le cycle aromatique,  $-(\text{CH}_2\text{)}_{1-3}\text{-OH}$ ,  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-}$  ou  $-(\text{CH}_2\text{)}_{1-5}\text{-NR}_5\text{R}_6$ , et  $ZZ_a$  est une unité  $\alpha$ -aminoacide naturelle ou non naturelle ;

étant entendu que  $X_1$ ,  $X_2$  et Lys ont chacun la configuration L ;

ou bien est un sel pharmaceutiquement acceptable ou une forme protégée d'un composé de formule générale (I).

5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'analogue agoniste de la somatostatine est un composé de formule générale (III)



III

dans laquelle R est NR<sub>10</sub>R<sub>11</sub>-C<sub>2-6</sub>alkylène ou guanidine-C<sub>2-6</sub>alkylène, et chacun de R<sub>10</sub> et R<sub>11</sub> est indépendamment H ou C<sub>1-4</sub>alkyle

5 ou bien est un sel pharmaceutiquement acceptable ou une forme protégée d'un composé de formule générale (II).

10 6. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'analogue agoniste de la somatostatine est choisi parmi le groupe composé du lanréotide, de l'octréotide, du vapréotide, du SOM 230, du MK-678, du BIM-23190, du BIM-23197, du BIM-23268, du PTR-3173, du TT-232, du peptide de formule c[Tic-Tyr-DTrp-Lys-Abu-Phe], du peptide KE 108 de formule  $\text{Tyr}^0$ -(cyclo-D-Dab-Arg-Phe-Phe-D-Trp-Lys—Thr-Phe) et des sels pharmaceutiquement acceptables et formes protégées de ces derniers.

15 7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée en ce que l'analogue agoniste de la somatostatine est le lanréotide ou un des sels pharmaceutiquement acceptables de ce dernier.

8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une femme ayant un facteur de risque de ménopause précoce.

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une femme atteinte d'une micro-délétion du chromosome X.

5 10. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une femme ayant des ovaires polykystiques.

11. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le médicament est destiné à être administré à une femme sur le point de subir, subissant ou ayant subi une chimiothérapie ou une irradiation.

10 12. Utilisation de la somatostatine ou d'un de ses analogues agonistes dans des tests toxicologiques relatifs à un autre composé afin de déterminer la présence ou l'absence d'un effet d'accélération de la croissance folliculaire causée par causé par ledit autre composé.

15 13. Utilisation d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour préparer un médicament destiné à accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents chez la femme non ménopausée.

14. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'analogue antagoniste de la somatostatine est choisi parmi les peptides de formule générale (III)



(III)

20 dans laquelle :

$A^1$  est un  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ;

$A^2$  est un  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ;

$A^3$  est Dab, Dap, Lys ou Orn ;

$A^4$  est  $\beta$ -Hydroxyvaline, Ser, Hser, ou Thr ;

25  $A^5$  est un D- ou L- $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué ; et

$Y^1$  est OH, NH<sub>2</sub> ou NHR<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> étant (C<sub>1-6</sub>)alkyle ;

chaque  $\alpha$ -aminoacide aromatique éventuellement substitué étant éventuellement substitué avec un ou des substituants choisis indépendamment parmi le groupe composé d'un atome halogène et des groupes NO<sub>2</sub>, OH, CN,

30 (C<sub>1-6</sub>)alkyl, (C<sub>2-6</sub>)alkényle, (C<sub>2-6</sub>)alkynyle, (C<sub>1-6</sub>)alkoxy, Bzl, O-Bzl et NR<sup>9</sup>R<sup>10</sup>, R<sup>9</sup> et R<sup>10</sup> étant chacun indépendamment H, O, ou (C<sub>1-6</sub>) alkyle ; et

chaque atome d'azote de liaison amide peptidique et le groupe amino de A<sup>1</sup> étant éventuellement substitué avec un groupe méthyle, étant entendu qu'il y a au moins un tel groupe méthyle dans un peptide de formule générale (III) ;

et les sels pharmaceutiquement acceptables et formes protégées de tels peptides.

5 15. Utilisation selon la revendication 13, caractérisée en ce que l'analogue antagoniste de la somatostatine est choisi parmi le groupe composé :

❖ les peptides suivants :

- Cpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp-N-Me-Lys-Thr-Cys]-D-Trp-NH<sub>2</sub> ;
- Cpa-cyclo[D-Cys-Tyr-D-Trp- N-Me-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH<sub>2</sub> ;
- Cpa-cyclo[D-Cys-Pal-D-Trp- N-Me-Lys-Thr-Cys]-Nal-NH<sub>2</sub> ;

10 ❖ le peptide connu sous le nom de code AC-178,335 ;

❖ l'octapeptide connu sous le nom de code ODN-8 ;

❖ le peptide connu sous le nom de code SB-710411 ;

❖ le peptide connu sous le nom de code BIM-23056 ;

15 ❖ le composé connu sous le nom de code BN-81674 ;

❖ le composé connu sous le nom de code SRA-880 ;

et des sels pharmaceutiquement acceptables et formes protégées de ces derniers.

16. Utilisation d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour soutenir le développement folliculaire *in vitro*.

20 17. Utilisation d'un analogue antagoniste de la somatostatine dans des tests toxicologiques relatifs à un autre composé afin de déterminer la présence ou l'absence d'un effet de ralentissement de la croissance folliculaire causé par ledit autre composé.

1/3

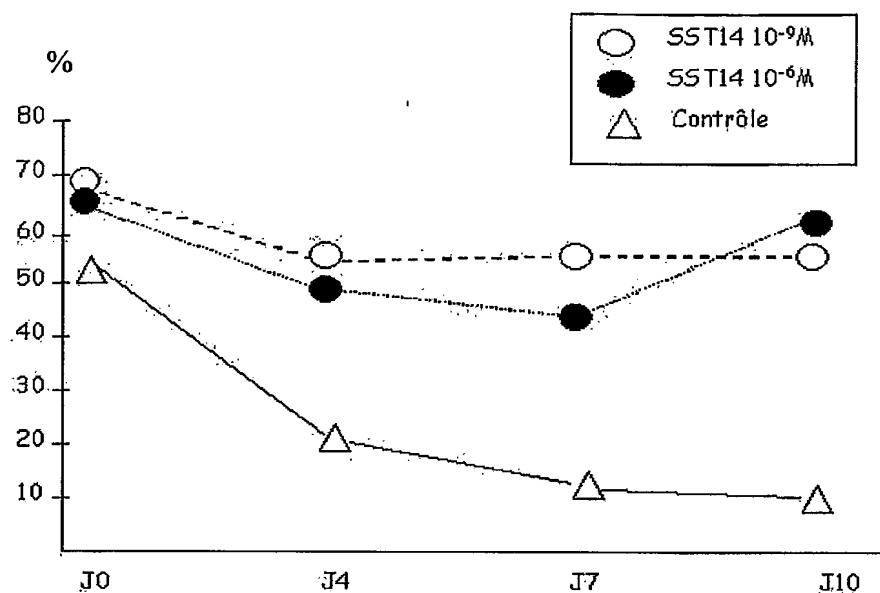


Figure 1

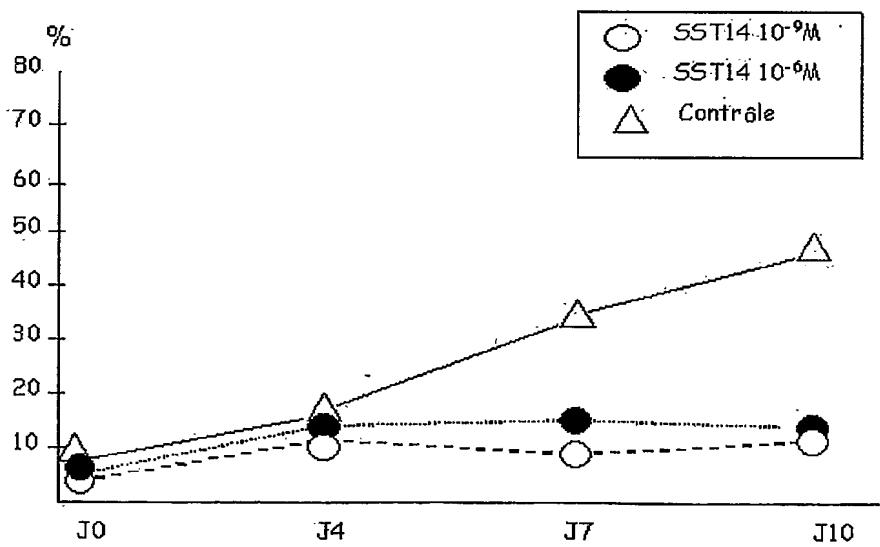


Figure 2

2/3

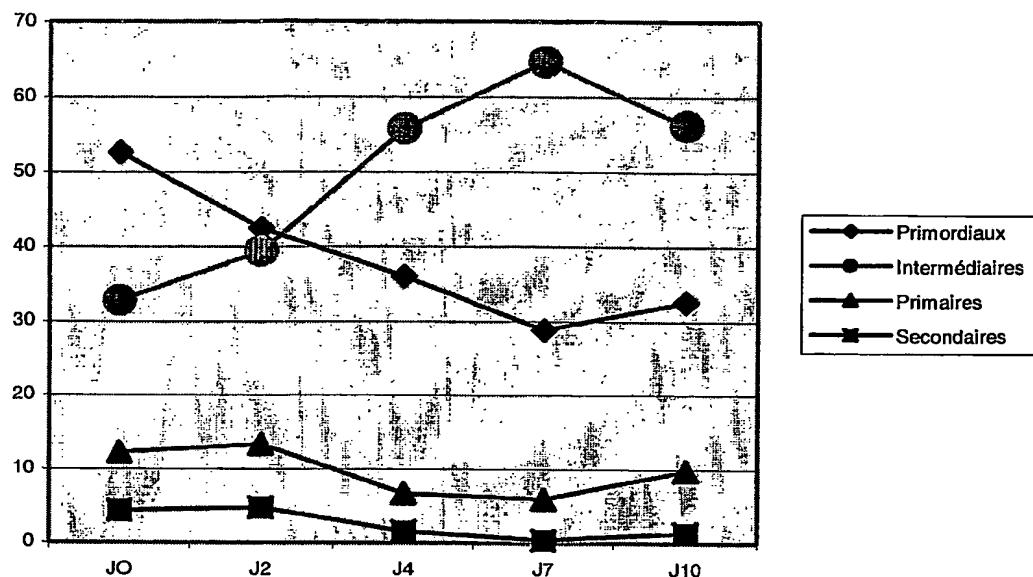


Figure 3

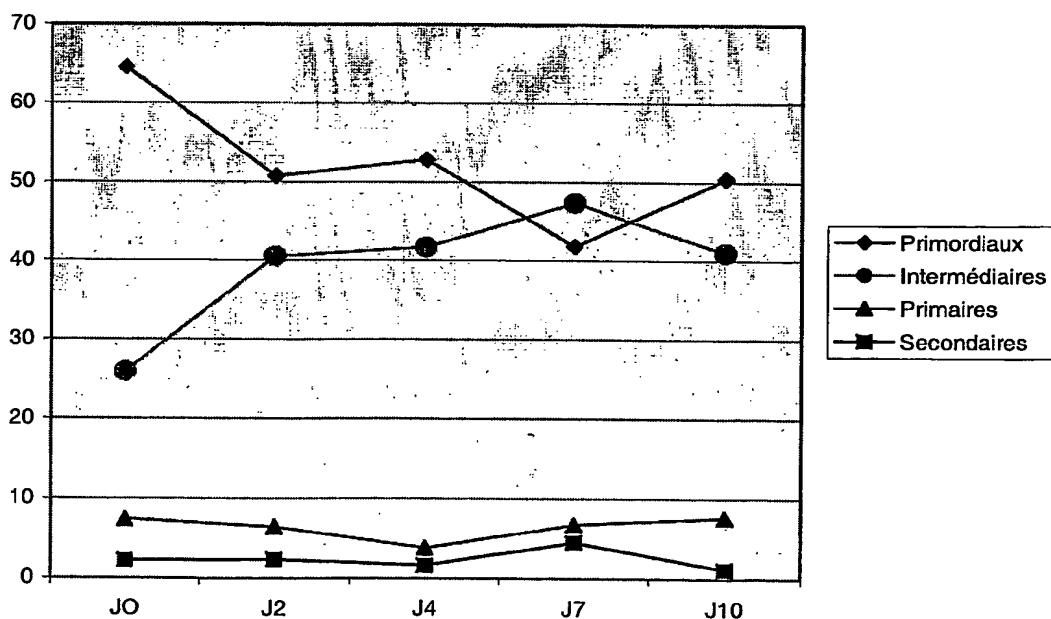


Figure 4

3/3

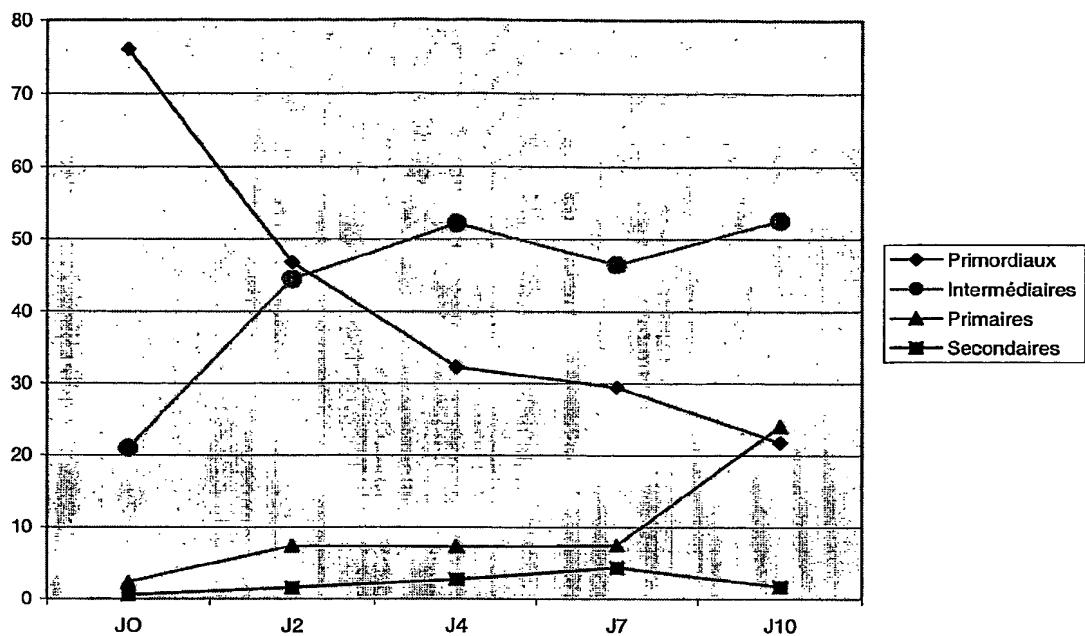


Figure 5

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**21 avril 2005 (21.04.2005)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 2005/034989 A3**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**  
**A61K 38/31, 38/16**

**(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
**PCT/FR2004/002536**

**(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**(22) Date de dépôt international :** 8 octobre 2004 (08.10.2004)

**(25) Langue de dépôt :** français

**(26) Langue de publication :** français

**(30) Données relatives à la priorité :**  
03292505.9 10 octobre 2003 (10.10.2003) EP

**Publiée :**

— *avec rapport de recherche internationale*  
— *avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues*

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUE (S.C.R.A.S.) [FR/FR]; 42, rue du Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).

**(72) Inventeurs; et**

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** GOUGEON, Alain [FR/FR]; 6, rue des Anémones, F-69630 Chaponost (FR). LOUMAYE, Ernest [BE/FR]; Domaine de Quincy, Rue de l'Eglise, F-74140 Massongy (FR).

**(74) Mandataire :** BOURGOUIN, André; IPSEN - S.C.R.A.S., Direction de la Propriété Intellectuelle, 24, rue Erlanger, F-75781 Paris Cedex 16 (FR).

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:** 16 juin 2005

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**(54) Title:** USE OF SOMATOSTATIN OR ONE OF THE ANALOGS THEREOF FOR PRODUCING A MEDICAMENT SERVING TO REGULATE THE OVARIAN FOLLICULAR RESERVE IN NON-MENOPAUSAL WOMEN

**A3**

**(54) Titre :** UTILISATION DE LA SOMATOSTATINE OU D'UN DE SES ANALOGUES POUR PREPARER UN MEDICAMENT DESTINE A REGULER LA RESERVE FOLLICULAIRE OVARIENNE CHEZ LA FEMME NON MENOPAUSEE

**WO 2005/034989**

**(57) Abstract:** The invention primarily relates to the use of somatostatin or one of the agonistic analogs thereof for producing a medicament serving to regulate the ovarian follicular reserve and, in particular, to reduce the depletion of the ovarian follicular reserve over time in non-menopausal women or to the use of an antagonistic analog of somatostatin for producing a medicament serving to accelerate the start of growing of quiescent follicles in non-menopausal women. The invention also relates to *in vitro* applications of somatostatin and of agonistic and antagonistic analogs thereof.

**(57) Abrégé :** L'invention concerne notamment l'utilisation de la somatostatine ou d'un de ses analogues agonistes pour préparer un médicament destiné à réguler la réserve folliculaire ovarienne, et en particulier à diminuer l'épuisement de la réserve folliculaire ovarienne avec le temps, chez la femme non ménopausée, ou celle d'un analogue antagoniste de la somatostatine pour préparer un médicament destiné à accélérer l'entrée en croissance des follicules quiescents chez la femme non ménopausée. Elle concerne également des applications *in vitro* de la somatostatine et de ses analogues agonistes et antagonistes.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/EP2004/002536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 A61K38/31 A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01/96393 A (LAITINEN MIKA PETRI ESAIAS ; RITVOS OLLI VISA PEKKA (FI); VUOJOLAINEN) 20 December 2001 (2001-12-20) claims	1-17
A	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM), BETHESDA, MD, US; January 2001 (2001-01), NILSSON E ET AL: "Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis." XP002290490 Database accession no. NLM11223364 abstract	1-17

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

29 April 2005

Date of mailing of the International search report

06/05/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gohlke, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l	Application No
PL1/rR2004/002536	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	<p>&amp; JOURNAL OF THE SOCIETY FOR GYNECOLOGIC INVESTIGATION. 2001 JAN-FEB, vol. 8, no. 1 Suppl Proceedings, January 2001 (2001-01), pages S17-S20, ISSN: 1071-5576</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989, MACLACHLAN V ET AL: "A CONTROLLED STUDY OF LHRH AGONIST BUSERELIN FOR THE INDUCTION OF FOLLICULOGENESIS BEFORE IN-VITRO FERTILIZATION" XP002290491 Database accession no. PREV198988030508 abstract &amp; NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 320, no. 19, 1989, pages 1233-1237, ISSN: 0028-4793</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 2000, DE VET A ET AL: "Regulation of early follicle development" XP002290492 Database accession no. EMB-2000168667 abstract &amp; TIJDSCHRIFT VOOR FERTILITEITSONDERZOEK 2000 NETHERLANDS, vol. 14, no. 1, 2000, pages 2-9, ISSN: 0921-7304</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 1998 (1998-06), VAN DER MEER M ET AL: "Octreotide, a somatostatin analogue, alters ovarian sensitivity to gonadotrophin stimulation as measured by the follicle stimulating hormone threshold in polycystic ovary syndrome" XP002290493 Database accession no. PREV199800353993 cited in the application abstract &amp; HUMAN REPRODUCTION (OXFORD), vol. 13, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 1465-1469, ISSN: 0268-1161</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int	Application No
P	004/002536

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	REUBI J C ET AL: "A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 456, 2002, pages 45-49, XP002276363 ISSN: 0014-2999 cited in the application abstract -----	6
A	WO 97/01579 A (SANDOZ LTD; SANDOZ-PATENT-GMBH; SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSC) 16 January 1997 (1997-01-16) cited in the application claims 5-10 -----	4
A	WO 02/10192 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H; ALBER) 7 February 2002 (2002-02-07) cited in the application page 19, paragraph 4; claims -----	5
A	WO 02/072602 A (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND; COY, DAVID, H; MURP) 19 September 2002 (2002-09-19) cited in the application claims -----	14

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
PCT/FR2004/002536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0196393	A 20-12-2001	NZ 502796 A		28-02-2003
		AU 6795001 A		24-12-2001
		CA 2410532 A1		20-12-2001
		EP 1294755 A2		26-03-2003
		JP 2004503236 T		05-02-2004
		WO 0196393 A2		20-12-2001
		US 2004267003 A1		30-12-2004
		ZA 200210122 A		30-09-2003
WO 9701579	A 16-01-1997	AT 210152 T		15-12-2001
		AU 714447 B2		06-01-2000
		AU 6515096 A		30-01-1997
		BR 9609335 A		25-05-1999
		CA 2222524 A1		16-01-1997
		CN 1189166 A ,C		29-07-1998
		CZ 9704196 A3		13-05-1998
		DE 69617687 D1		17-01-2002
		DE 69617687 T2		22-08-2002
		DK 835263 T3		02-04-2002
		WO 9701579 A2		16-01-1997
		EP 0835263 A2		15-04-1998
		ES 2169251 T3		01-07-2002
		HU 9901455 A2		28-09-1999
		JP 3445796 B2		08-09-2003
		JP 11506108 T		02-06-1999
		JP 2003104998 A		09-04-2003
		NO 976064 A		16-02-1998
		NZ 313147 A		29-11-1999
		PL 323943 A1		27-04-1998
		PT 835263 T		29-04-2002
		RU 2160741 C2		20-12-2000
		SI 835263 T1		30-06-2002
		SK 177097 A3		05-08-1998
		TR 9701718 T1		21-05-1998
		TW 491854 B		21-06-2002
		US 6225284 B1		01-05-2001
		ZA 9605538 A		29-12-1997
WO 0210192	A 07-02-2002	AU 8977801 A		13-02-2002
		BR 0112859 A		01-07-2003
		CA 2416293 A1		07-02-2002
		CN 1446229 A		01-10-2003
		CZ 20030288 A3		14-05-2003
		WO 0210192 A2		07-02-2002
		EP 1307486 A2		07-05-2003
		HU 0300684 A2		29-09-2003
		JP 2004505095 T		19-02-2004
		MX PA03000991 A		09-06-2003
		NO 20030484 A		19-03-2003
		NZ 523836 A		27-08-2004
		PL 358718 A1		09-08-2004
		SK 1212003 A3		05-08-2003
		US 2005014686 A1		20-01-2005
		ZA 200300406 A		02-04-2004
WO 02072602	A 19-09-2002	CA 2439498 A1		19-09-2002
		CZ 20032281 A3		14-01-2004
		EP 1372688 A2		02-01-2004

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int Application No  
PCT/FR2004/002536

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 02072602	A	HU 0401535 A2	28-12-2004
		JP 2004532824 T	28-10-2004
		NO 20033911 A	29-10-2003
		PL 362838 A1	02-11-2004
		WO 02072602 A2	19-09-2002
		US 2004181032 A1	16-09-2004

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem internationale No  
PCT/FR2004/002536

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K38/31 A61K38/16

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 01/96393 A (LAITINEN MIKA PETRI ESAIAS ; RITVOS OLLI VISA PEKKA (FI); VUOJOLAINEN) 20 décembre 2001 (2001-12-20) revendications	1-17
A	DATABASE MEDLINE 'Online! US NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE (NLM). BETHESDA, MD, US; janvier 2001 (2001-01), NILSSON E ET AL: "Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis." XP002290490 Database accession no. NLM11223364 abrégé	1-17 -/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

29 avril 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

06/05/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gohlke, P

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De  
ernationale No  
PCT/FR2004/002536

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	<p>&amp; JOURNAL OF THE SOCIETY FOR GYNECOLOGIC INVESTIGATION. 2001 JAN-FEB, vol. 8, no. 1 Suppl Proceedings, janvier 2001 (2001-01), pages S17-S20, ISSN: 1071-5576</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989, MACLACHLAN V ET AL: "A CONTROLLED STUDY OF LHRH AGONIST BUSERELIN FOR THE INDUCTION OF FOLLICULOGENESIS BEFORE IN-VITRO FERTILIZATION" XP002290491 Database accession no. PREV198988030508 abrégé &amp; NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 320, no. 19, 1989, pages 1233-1237, ISSN: 0028-4793</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 2000, DE VET A ET AL: "Regulation of early follicle development" XP002290492 Database accession no. EMB-2000168667 abrégé &amp; TIJDSCHRIFT VOOR FERTILITEITSONDERZOEK 2000 NETHERLANDS, vol. 14, no. 1, 2000, pages 2-9, ISSN: 0921-7304</p> <p>-----</p> <p>A DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juin 1998 (1998-06), VAN DER MEER M ET AL: "Octreotide, a somatostatin analogue, alters ovarian sensitivity to gonadotrophin stimulation as measured by the follicle stimulating hormone threshold in polycystic ovary syndrome" XP002290493 Database accession no. PREV199800353993 cité dans la demande abrégé &amp; HUMAN REPRODUCTION (OXFORD), vol. 13, no. 6, juin 1998 (1998-06), pages 1465-1469, ISSN: 0268-1161</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-17
		1-17
		1-17

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem  
ernationale No  
PCT/FR2004/002536

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	REUBI J C ET AL: "A new peptidic somatostatin agonist with high affinity to all five somatostatin receptors" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 456, 2002, pages 45-49, XP002276363 ISSN: 0014-2999 cité dans la demande abrégé -----	6
A	WO 97/01579 A (SANDOZ LTD; SANDOZ-PATENT-GMBH; SANDOZ-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSC) 16 janvier 1997 (1997-01-16) cité dans la demande revendications 5-10 -----	4
A	WO 02/10192 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H; ALBER) 7 février 2002 (2002-02-07) cité dans la demande page 19, alinéa 4; revendications -----	5
A	WO 02/072602 A (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND; COY, DAVID, H; MURP) 19 septembre 2002 (2002-09-19) cité dans la demande revendications -----	14

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Internationale No

004/002536

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
WO 0196393	A	20-12-2001	NZ	502796 A	28-02-2003
			AU	6795001 A	24-12-2001
			CA	2410532 A1	20-12-2001
			EP	1294755 A2	26-03-2003
			JP	2004503236 T	05-02-2004
			WO	0196393 A2	20-12-2001
			US	2004267003 A1	30-12-2004
			ZA	200210122 A	30-09-2003
WO 9701579	A	16-01-1997	AT	210152 T	15-12-2001
			AU	714447 B2	06-01-2000
			AU	6515096 A	30-01-1997
			BR	9609335 A	25-05-1999
			CA	2222524 A1	16-01-1997
			CN	1189166 A ,C	29-07-1998
			CZ	9704196 A3	13-05-1998
			DE	69617687 D1	17-01-2002
			DE	69617687 T2	22-08-2002
			DK	835263 T3	02-04-2002
			WO	9701579 A2	16-01-1997
			EP	0835263 A2	15-04-1998
			ES	2169251 T3	01-07-2002
			HU	9901455 A2	28-09-1999
			JP	3445796 B2	08-09-2003
			JP	11506108 T	02-06-1999
			JP	2003104998 A	09-04-2003
			NO	976064 A	16-02-1998
			NZ	313147 A	29-11-1999
			PL	323943 A1	27-04-1998
			PT	835263 T	29-04-2002
			RU	2160741 C2	20-12-2000
			SI	835263 T1	30-06-2002
			SK	177097 A3	05-08-1998
			TR	9701718 T1	21-05-1998
			TW	491854 B	21-06-2002
			US	6225284 B1	01-05-2001
			ZA	9605538 A	29-12-1997
WO 0210192	A	07-02-2002	AU	8977801 A	13-02-2002
			BR	0112859 A	01-07-2003
			CA	2416293 A1	07-02-2002
			CN	1446229 A	01-10-2003
			CZ	20030288 A3	14-05-2003
			WO	0210192 A2	07-02-2002
			EP	1307486 A2	07-05-2003
			HU	0300684 A2	29-09-2003
			JP	2004505095 T	19-02-2004
			MX	PA03000991 A	09-06-2003
			NO	20030484 A	19-03-2003
			NZ	523836 A	27-08-2004
			PL	358718 A1	09-08-2004
			SK	1212003 A3	05-08-2003
			US	2005014686 A1	20-01-2005
			ZA	200300406 A	02-04-2004
WO 02072602	A	19-09-2002	CA	2439498 A1	19-09-2002
			CZ	20032281 A3	14-01-2004
			EP	1372688 A2	02-01-2004

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Dem **Internationale No**  
PC **2004/002536**

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02072602	A	HU 0401535 A2	28-12-2004
		JP 2004532824 T	28-10-2004
		NO 20033911 A	29-10-2003
		PL 362838 A1	02-11-2004
		WO 02072602 A2	19-09-2002
		US 2004181032 A1	16-09-2004

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**